



## Rendang daging sapi



© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Komposisi .....	1
4 Syarat mutu .....	2
5 Pengambilan contoh.....	2
6 Cara uji. ....	2
7 Syarat lulus uji .....	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh rendang daging sapi .....	4
Lampiran B (normatif) Cara uji rendang daging sapi .....	8
Bibliografi .....	40
Gambar B.1 - Metoda pengenceran .....	24
Tabel 1 - Syarat mutu rendang daging sapi.....	2
Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg .....	5
Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg .....	6
Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg .....	6
Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg .....	7
Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	7
Tabel B.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh .....	28
Tabel B.2 - Reaksi biokimia dan serologi Salmonella.....	36
Tabel B.3 Reaksi biokima dan serologi untuk non <i>Salmonella</i> .....	37



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Rendang daging sapi* ini merupakan standar baru. Tujuan penyusunan standar ini untuk meningkatkan mutu produk dan melindungi kesehatan konsumen, serta mendorong ekspor produk dalam negeri.

Panitia teknis dalam menyusun rumusan SNI ini telah memperhatikan hal-hal yang tercantum dalam:

1. Undang-undang RI no.7 tahun 1996 tentang Pangan.
2. Undang-undang RI no.8 tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Peraturan Pemerintah no.69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
4. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan no.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
5. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan no.03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman. Standar ini telah dibahas dalam rapat-rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 November 2007 di Jakarta. yang dihadiri oleh wakil-wakil dari konsumen, produsen, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, laboratorium uji serta instansi teknis terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 4 Agustus 2008 sampai dengan 4 Oktober 2008 namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 4 November 2008 dengan hasil RASNI.



## Rendang daging sapi

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji untuk rendang daging sapi.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **rendang daging sapi**

produk yang dibuat dari potongan daging sapi, diberi bumbu, dimasak dengan santan kelapa dengan/atau tanpa penambahan bahan pangan lain, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

### 3 Komposisi

#### 3.1 Bahan baku utama

daging sapi.

#### 3.2 Bahan pangan lain

santan kelapa, cabe, bawang merah, bawang putih, lengkuas, jahe dan garam serta bahan pangan lain

#### 3.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk rendang daging sapi sesuai dengan ketentuan yang berlaku.



#### 4 Syarat mutu

Tabel 1 - Syarat mutu rendang daging sapi

No.	Kriteria	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal
1.2	Rasa	-	Khas rendang
1.3	Warna	-	Coklat sampai coklat kehitaman
2	Bobot daging (b/b)	%	Min. 50
3	Kadar air (b/b)	%	Maks. 20
4	Kadar abu (b/b)	%	Maks. 5
5	Kadar lemak (b/b)	%	Maks. 30
6	Kadar protein (b/b)	%	Min. 25
7	Cemaran logam:	-	-
7.1	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 2,0
7.2	Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks. 20,0
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0
7.4	Raksa (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03
8	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks. 1,0
9	Cemaran mikroba:		
9.1	Angka lempeng total	koloni/g	Maks. $1 \times 10^4$
9.2	Angka lempeng total Anaerob*	koloni/g	< 10
9.3	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	< 3
9.4	<i>Clostridium perfringens</i>	Koloni/g	< 10
9.5	<i>Salmonella</i>	-	Negatif/25g
9.6	Kapang/khamir	koloni/g	Maks. $1 \times 10^2$

\* untuk rendang yang dikemas dalam kaleng/vakum

#### 5 Pengambilan contoh.

Cara pengambilan contoh sesuai pada Lampiran A.

#### 6 Cara uji.

Cara uji rendang daging sapi seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran B.1.
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran B.2 .
  - Cara uji warna sesuai Lampiran B.2.1.
  - Cara uji bau sesuai Lampiran B.2.2.
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran B.2.3.
- Cara uji bobot daging sesuai lampiran B.3.
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran B.4.
- Cara uji kadar abu sesuai Lampiran B.5.
- Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran B.6.
- Cara uji kadar protein sesuai Lampiran B.7.
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran B.8.
  - Cara uji tembaga (Cu) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran B.8.1.
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran B.8.2.



- Cara uji raksa (Hg) sesuai Lampiran B.8.3
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran B.9
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran B.10
  - Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri *coliform*, dan Kapang/Khamir sesuai Lampiran B.10.1.
  - Cara uji Angka Lempeng Total sesuai Lampiran B.10.2.
  - Cara uji Angka Lempeng Total anaerob sesuai Lampiran B.10.2.
  - Cara uji bakteri *coliform* sesuai Lampiran B.10.3.
  - Cara uji *Clostridium perfringens* sesuai Lampiran B.10.4.
  - Cara uji *Salmonella* sesuai Lampiran B.10.5.
  - Cara uji kapang/khamir sesuai pada Lampiran B.10.6.

## 7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji bila memenuhi persyaratan mutu seperti pada Pasal 4.

## 8 Higiene

Rendang harus diproduksi secara higiene termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (CPPOB).

## 9 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi dan mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



## Lampiran A (normatif)

### Cara pengambilan contoh rendang daging sapi

#### A.1 Prinsip

Pengambilan contoh rendang daging sapi yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL (Acceptance Quality Level) 6,5 dan contoh diambil secara acak.

#### A.2 Penerapan pengambilan contoh

##### A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam A.3 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- Tingkat inspeksi;
- Ukuran lot (N);
- Ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam kg);
- Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

##### A.2.2 Inspeksi

- pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:  
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).  
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih meyakinkan;
- tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil rendang daging sapi;
- tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada A.3;
- ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot;
- uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar;
- gunakan rancangan pengambilan contoh pada A.3;
- nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c);

##### A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

###### A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 400 karton, setiap karton berisi 12 kemasan, masing-masing kemasan berukuran 350 g. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.



- a Ukuran lot (N) : 400 x 12 atau 4.800 unit
- b Ukuran kemasan : 350 g
- c Tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, A.3.1)
- d Ukuran contoh (n) : 6
- e Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 1

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 6 contoh yang diuji sama atau kurang dari 1 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 6 kemasan yang diuji lebih besar dari 1.

#### A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a Ukuran lot (N) : 400 x 12 atau 4.800 unit
- b Ukuran kemasan : 350 g
- c Tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, A.3.2)
- d Ukuran contoh (n) : 13
- e Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

#### A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 21 atau 29 dan menggunakan jumlah ketentuan, jumlah maksimum cacat yang diterima sebanyak 3 atau 4.

### A.3 Rancangan pengambilan contoh

#### A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13



**Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg  
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

**Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg**

Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
6	1
13	2
21	3
29	4
48	6
84	9
126	13

#### A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)

**Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19



**Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg  
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

<b>Ukuran lot (N)</b>	<b>Ukuran contoh (n)</b>	<b>Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)</b>
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

**Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg**

<b>Ukuran lot (N)</b>	<b>Ukuran contoh (n)</b>	<b>Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)</b>
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19



## Lampiran B (normatif)

### Cara uji rendang daging sapi

#### B.1 Persiapan contoh

Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

##### B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan rendang daging sapi, ambil contoh sesuai yang diperlukan minimum 200 g secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

##### B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan rendang daging sapi dan ambil contoh yang dibutuhkan.

##### B.1.3 Persiapan contoh untuk analisis kimia

Buka kemasan rendang daging sapi dan ambil contoh sesuai yang diperlukan minimum 200 g secara hati-hati dengan menggunakan sendok yang bersih dan kering kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering. Jika ukuran kemasan kurang dari 200 g maka ambil beberapa kemasan sehingga rendang daging sapi menjadi 200 g.

#### B.2 Keadaan

##### B.2.1 Warna

###### B.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan (mata).

###### B.2.1.2 Cara kerja

- buka tutup kemasan rendang daging sapi secara aseptis dan tebarkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- amati warna contoh uji;
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis, lanjutkan untuk uji bau

###### B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- jika terlihat warna khas rendang daging sapi maka hasil dinyatakan "**normal**";
- jika terlihat warna asing selain warna khas rendang daging sapi maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".



## B.2.2 Bau

### B.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

### B.2.2.2 Cara kerja

- Buka tutup kemasan rendang daging sapi secara aseptis dan tebarkan di atas wadah yang bersih dan kering
- Cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- Lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis

### B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tercium bau khas rendang daging sapi maka hasil dinyatakan "**normal**";
- Jika tercium bau asing selain bau khas rendang daging sapi maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

## B.2.3 Rasa

### B.2.3.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera rasa

### B.2.3.2 Cara kerja

- Buka tutup kemasan rendang daging sapi secara aseptis dan tebarkan diatas wadah yang bersih dan kering;
- Cicipi rasa rendang daging sapi untuk mengetahui rasanya
- Lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis

### B.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- Jika sewaktu dicicipi terasa khas rendang daging sapi dan tidak tengik maka hasil dinyatakan "**normal**";
- Jika terasa tidak khas rendang daging sapi dan tengik maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

## B.3 Bobot daging

### B.3.1 Prinsip

Penimbangan bagian daging setelah pemisahan dengan bagian bumbu dan membandingkan dengan bobot bersih

### B.3.2 Peralatan

- Neraca
- Cawan porselen
- Kuas halus



**B.3.3 Cara kerja**

- timbang kemasan beserta isinya, kemudian dibuka;
- timbang daging dengan bumbu ;
- pisahkan daging dengan bumbu, timbang bumbu;
- timbang kemasan dalam keadaan kosong setelah dicuci dan dikeringkan untuk menghilangkan sisa bumbu.

**B.3.4 Perhitungan :**

$$\text{Bobot tuntas} = \frac{C - B}{A - D} \times 100 \%$$

dengan :

A adalah berat rendang dengan kemasan (g)

B adalah berat bumbu (g)

C adalah berat daging dan bumbu (g)

D adalah berat kemasan (g)

**B.4 Kadar air.****B.4.1 Prinsip.**

Kadar air dihitung sebagai bobot yang hilang pada pemanasan dalam oven pada suhu 125 °C.

**B.4.2 Peralatan**

- Botol timbang tertutup
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- Desikator yang berisi desikan

**B.4.3 Cara kerja**

- Panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada suhu 125 °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam Desikator selama 45 menit kemudian timbang ( $W_0$ ).
- Masukan 1 g – 3 g contoh kedalam botol timbang, tutup dan di timbang ( $W_1$ )
- Panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup botol disamping botol timbang dalam oven pada suhu 125 °C selama 2 jam – 4 jam setelah suhu 125 °C
- Tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, pindahkan segera kedalam desikator dan gunakan selama 45 menit kemudian timbang ( $W_2$ )
- Lakukan pekerjaan duplo
- Hitung kadar air dalam contoh

**B.4.4 Perhitungan**

$$\text{Kadar Air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

dengan:

$W_0$  adalah Bobot botol timbang kosong dan tutupnya (g)

$W_1$  adalah Bobot botol timbang, tutup dan contoh sebelum dikeringkan (g)



$W_2$  adalah Bobot botol timbang, tutup dan contoh setelah dikeringkan (g)

#### B.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari nilai 5% atau deviasi lebih besar dari 3 % analisa harus diulang kembali.

### B.5 Kadar abu

#### B.5.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih.

#### B.5.2 Peralatan

- Cawan porselen atau platina atau kwarsa berukuran 50 ml – 100 ml
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- Neraca Analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- Desikator yang berisikan desikan

#### B.5.3 Cara Kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu 525 °C – 550 °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam Desikator selama 30 menit kemudian timbang ( $W_0$ );
- Masukan 3 g – 5 g contoh kedalam cawan dan timbang ( $W_1$ );
- Panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu  $(105 \pm 2)$  °C sampai  $H_2O$  hilang :
- Tambah beberapa tetes minyak Zaitun murni dan panaskan perlahan diatas api kecil atau lampu IR sampai pengembangannya berhenti
- Tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu 525 °C – 550 °C sampai terbentuk abu berwarna putih
- Tambahkan air kedalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik, kemudian diabukan kembali pada suhu 525 °C sampai mencapai berat yang tetap
- Pindahkan segera dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang ( $W_2$ )
- Lakukan pekerjaan Duplo dan
- Hitung kadar abu dalam contoh

#### B.5.4 Perhitungan :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

dengan :

$W_0$  adalah Bobot cawan kosong (g)

$W_1$  adalah Bobot cawan kosong dan contoh sebelum diabukan (g)

$W_2$  adalah Bobot cawan kosong dan contoh setelah diabukan (g)



**B.5.5 Ketelitian :**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dan nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (RSD) maksimal 3 % jika kisaran lebih besar dari 5 % atau (RSD) lebih besar dari 3 % maka analisis harus diulang kembali.

**B.6 Kadar lemak****B.6.1 Prinsip**

Contoh uji yang telah dikeringkan diekstraksi dengan dua tahap perlakuan menggunakan pelarut non polar untuk lemak (petroleum eter atau heksana).

Pelarut dapat dikumpulkan kembali dengan kondensasi. Ekstrak yang tertinggal dikeringkan dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

**B.6.2 Perekasi**

- a) Petroleum eter atau heksana;
- b) Pasir ;
- c) Kapas bebas lemak.

**B.6.3 Peralatan**

- a) Soxhlet atau seperangkat "Soxtec System" beserta cup ekstraksi;
- b) Pemanasan listrik yang dilengkapi dengan pendingin;
- c) Labu lemak 250 ml;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Selongsong kertas atau thimble;
- f) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- g) Pengaduk kaca;
- h) Desikator yang berisi desikan.

**B.6.4 Cara kerja**

- a) timbang dengan teliti 3 gram contoh ke dalam selongsong kertas, tambahkan pasir dan aduk dengan pengaduk kaca;
- b) keringkan dalam oven pada suhu 125 °C selama 1 jam;
- c) keluarkan dari oven dan dinginkan;
- d) longgarkan selongsong kertas dengan pengaduk kaca, bersihkan pengaduk kaca tersebut dengan kapas dan masukkan kapas tersebut ke dalam selongsong kertas;
- e) jika menggunakan *soxtec system* maka masukkan selongsong kertas tersebut ke dalam cup ekstraksi yang telah berisi batu didih dan telah ditimbang ( $W_0$ );
- f) ekstrak selongsong yang berisi contoh kering itu dengan 40 ml petroleum eter atau heksana pada posisi *boiling* selama 25 menit dan *rinsing* selama 30 menit.
- g) atur temperatur unit ekstraksi sehingga laju kondensasi  $\geq 5$  tetes/ detik dan lanjutkan ke prosedur (k);
- h) Jika menggunakan soxhlet maka sumbat selongsong kertas dengan kapas kemudian masukkan ke dalam alat ekstraksi soxhlet yang telah dihubungkan dengan labu lemak. Labu lemak tersebut telah berisi batu didih dan telah dikeringkan serta telah diketahui bobotnya ( $W_0$ );
- i) ekstrak dengan petroleum eter atau heksana selama  $\pm 6$  jam;
- j) suilingkan petroleum eter atau heksana;
- k) keringkan ekstrak lemak dalam oven pada suhu 125 °C selama 30 menit;
- l) dinginkan dalam desikator selama 30 menit dan timbang hingga bobot tetap ( $W_1$ ).



### B.6.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{W - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

W adalah bobot contoh, (g);

W<sub>0</sub> adalah bobot labu lemak atau cup ekstraksi, (g);

W<sub>1</sub> adalah bobot labu lemak atau cup ekstraksi dan residu, (g).

### B.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar lemak atau deviasi (*RSD*) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau *RSD* lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

## B.7 Kadar protein (N×6,25)

### B.7.1 Prinsip

Rendang daging didestruksi dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> menggunakan CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O sebagai katalis dan K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi NH<sub>3</sub> pada saat destilasi menggunakan NaOH. NH<sub>3</sub> yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein kornet daging sapi diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

### B.7.2 Pereaksi

- Asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat bebas nitrogen;
- Larutkan 5 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- Katalis selen ;  
Campurkan 4 g serbuk SeO<sub>2</sub>, 150 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> atau Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan 30 g CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O
- Kalium sulfat (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bebas nitrogen;
- Batu didih;
- Larutan indikator *methyl red* (MR) dan *bromocresol green* (BCG)  
Larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan asam borat, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4 %;  
Larutkan 40 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red* dan *bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- Larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;  
Larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet
- Larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %;  
Larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml
- Larutan asam klorida, HCl 0,1M  
Pipet dengan hati-hati 8,60 ml HCl pekat (36,5 % – 38 %) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis



**B.7.3 Peralatan**

- a) Labu Kjeldahl 100 ml;
- b) Pemanas listrik/alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Buret 10 ml terkalibrasi

**B.7.4 Cara kerja**

- a) timbang 2,0 g – 2,2 g contoh ke dalam labu kjeldahl, tambahkan 15,00 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 ml larutan katalis CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O atau 1 g campuran katalis selen, 8 - 10 batu didih dan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisap asap;
- c) Biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 75 ml larutan NaOH 30 %. (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) sulingkan selama 5 menit sampai 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4 %;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) Titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 N;
- h) kerjakan penetapan blanko.

**B.7.5 Perhitungan**

$$\text{Kadar Protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 6,25 \times 100 \%}{W}$$

dengan:

V<sub>1</sub> adalah Volume HCl 0,1 N untuk titrasi contoh (ml);

V<sub>2</sub> adalah Volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko (ml);

N adalah Normalitas larutan HCl;

W adalah bobot contoh (mg);

14,008 adalah bobot atom Nitrogen.

6,25 adalah faktor protein daging dan produk daging

**B.7.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

**B.8 Cemarkan logam****B.8.1 Penetapan cemarkan logam timbal (Pb) dan tembaga (Cu).****B.8.1.1 Prinsip**

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dan panjang gelombang maksimal 324 nm untuk Cu dan 283 nm untuk Pb.



**B.8.1.2 Peralatan**

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml – 100 ml;
- c) penangas listrik;
- d) kertas Whatman No. 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- f) spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu dan Pb) terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- j) gelas piala 250 ml;
- k) penangas air.

**B.8.1.3 Pereaksi**

- a) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat (37 %, Bj 1,19);
- c) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
Encerkan 7 ml  $\text{HNO}_3$  65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
Encerkan 500 ml  $\text{HCl}$  37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 % dalam alkohol;  
larutkan 10 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Cu;  
larutkan 1,000 g Cu dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- g) larutan baku 200  $\mu\text{g/ml}$  Cu  
pipet 10 ml larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Cu ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/ml}$  Cu.
- h) larutan baku 20  $\mu\text{g/ml}$  Cu;  
pipet 10 ml larutan baku 200  $\mu\text{g/ml}$  Cu ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/ml}$  Cu.
- i) larutan baku kerja Cu;  
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml; 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20  $\mu\text{g/ml}$  kemudian tambahkan 5 ml larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,8  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,4  $\mu\text{g/ml}$  dan 1,8  $\mu\text{g/ml}$  Cu.
- j) larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- k) larutan baku 50  $\mu\text{g/ml}$  Pb;  
pipet 5,0 ml larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- l) larutan kerja baku Pb;



pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 ml dan 5 ml larutan baku 50 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO<sub>3</sub> 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2,0 µg/ml dan 2,5 µg/ml Pb.

#### **B.8.1.4 Cara kerja**

- timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji terbakar dan tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml MgNO<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O 10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO<sub>3</sub> pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N atau 5 ml HNO<sub>3</sub> 1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
- jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring Whatman No.41 ke dalam labu ukur 50 ml;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 324 nm untuk Cu dan 283 nm untuk Pb.
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- hitung konsentrasi logam dalam contoh.

#### **B.8.1.5 Perhitungan hasil**

$$\text{Konsentrasi logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

#### **B.8.1.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 % maka analisis harus diulang



## B.8.2 Penetapan timah (Sn)

### B.8.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian ditambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

### B.8.2.2 Pereaksi

- larutan kalium klorida, 10 mg K /ml;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air menjadi 100 ml.
- asam nitrat pekat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- asam klorida pekat,  $\text{HCl}$  pekat;
- larutan baku 1000 mg/l Sn;  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 ml  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 ml larutan  $\text{KCl}$  ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 15  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$  dan 25  $\mu\text{g/ml}$  Sn.

### B.8.2.3 Peralatan

- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- erlenmeyer 250 ml;
- penangas listrik;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- gelas ukur kapasitas 50 ml;
- gelas piala 250 ml;
- penangas air.

### B.8.2.4 Cara kerja

- timbang 5 g sampai 10 g contoh ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml  $\text{HNO}_3$  pekat, dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sampai sisa volume 3 ml sampai 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang.
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml  $\text{HCl}$  pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap  $\text{Cl}_2$  berhenti.
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sampai sisa volume 10 ml sampai 15 ml.
- tambahkan 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- tambahkan 1,0 ml  $\text{KCl}$ , dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan  $\text{H}_2\text{O}$ , dan saring.
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ ;



- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) hitung kandungan logam Sn dalam contoh.

#### B.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )

V adalah volume larutan akhir (ml);

m adalah bobot contoh (g).

#### B.8.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

### B.8.3 Penetapan raksa (Hg)

#### B.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

#### B.8.3.2 Pereaksi

- a) asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N;
- b) asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 N;
- c) batu didih;
- d) campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- e) hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- f) larutan molibdat 2 %.
- g) larutan pereduksi;  
campurkan 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i) larutan pengencer;  
masukkan 300 ml – 500 ml air suling ke dalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml  $\text{HNO}_3$  kemudian 67 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Bisa digunakan larutan baku.
- k) larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  Hg;  
Pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.



- l) Larutan baku kerja Hg;  
Pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 µg/ml; 0,005 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml Hg.

### B.8.3.3 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Gelas ukur 25 ml;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.

### B.8.3.4 Cara kerja

#### B.8.3.4.1 Pengabuan basah

- timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 N, 20 ml HNO<sub>3</sub> 7 N, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 – 6 batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 ml HNO<sub>3</sub> – HClO<sub>4</sub> (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- pipet 25 ml larutan diatas kedalam labu 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu x dan absorbans sebagai sumbu y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- Lakukan pengerjaan duplo dan ;
- hitung konsentrasi Hg dalam contoh.



**B.8.3.4.2 Destruksi menggunakan digester microwave dengan sistim tertutup**

- timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- lakukan pengerjaan duplo
- Hitung konsentrasi Hg dalam contoh.

**B.8.3.5 Perhitungan**

$$\text{Konsentrasi Hg (mg/kg)} = \frac{C}{n} \times V \times fp$$

dengan:

C adalah konsentrasi Hg dari kurva kalibrasi, ( $\mu\text{g/ml}$ )

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g)

fp adalah faktor pengenceran.

**B.8.3.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

**B.9 Cemarkan arsen (As)****B.9.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

**B.9.2 Peralatan**

- spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- labu Kjeldahl 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml.
- gelas ukur 25 ml



- i) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- j) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.
- k) Labu borosikat berdasar bulat 50 ml

### B.9.3 Perekasi

- a) asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat
- c) natrium boronhidrida,  $\text{NaBH}_4$  ;  
Larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- d) asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
Larutkan 66 ml  $\text{HCl}$  37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;  
Timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml  $\text{HCl}$  37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %;  
Timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  As;  
Larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan baku 100  $\mu\text{g/ml}$  As;  
Pipet 10 ml larutan baku arsen 1000  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  As.
- i) larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As;  
Pipet 1 ml larutan standar arsen 100  $\text{mg/l}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  As.
- j) larutan baku kerja As;  
Pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$  dan 0,05  $\mu\text{g/ml}$  As.

### B.9.4 Cara kerja

#### B.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh dalam labu Kjeldahl 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 ml sampai 8 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 ml  $\text{HClO}_4$  sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 ml amonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;



- g) pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh;

#### B.9.4.2 Destruksi dengan *microwave* atau dengan sistem tertutup

- a) timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) pipet 5 ml -10 ml larutan destruksi (C) ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambah 1 ml larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur pada suhu  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan dan larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,05  $\mu\text{g/ml}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- k) lakukan pengerjaan duplo;
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

#### B.9.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi As (mg/kg)} = \frac{C}{n} \times V \times fp$$

dengan:

C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, ( $\mu\text{g/ml}$ )

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g);

fp adalah faktor pengenceran.

#### B.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.



## B.10 Cemarkan mikroba

### B.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, bakteri *coliform*, dan Kapang/Khamir

#### B.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### B.10.1.2 Peralatan

- alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 8000 rpm - 450000 rpm;
- neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- gelas piala steril;
- labu erlenmeyer steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril;
- tabung reaksi;
- alat pembuka kemasan steril;
- pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- penangas listrik.

#### B.10.1.3 Larutan Pengencer

*Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);*

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  34 g
- air suling 500 ml

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tepatkan volume sampai 1000 ml dengan air destilata. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air destilata sampai volume 1000 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 90 ml, atau  $(99 \pm 1)$  ml dan siterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### B.10.1.4 Cara kerja

- Ditimbang 25 g contoh yang telah dihaluskan dengan blender masukan kedalam botol yang telah berisi 225 ml larutan pengencer, sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10 ;
- Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen

## B.10.2 Angka lempeng Total

### B.10.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok selama 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1)$  °C .



**B.10.2.2 Peralatan**

- a) cawan petri dari gelas/plastik 90 mm – 100 mm;
- b) pipet ukur 1,5 dan 10 ml;
- c) penangas air ( $45 \pm 1$ ) °C;
- d) lemari pengering ( $36 \pm 1$ ) °C;
- e) alat penghitung koloni (*Colony Counter*);
- f) *autoclave*;
- g) oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi.

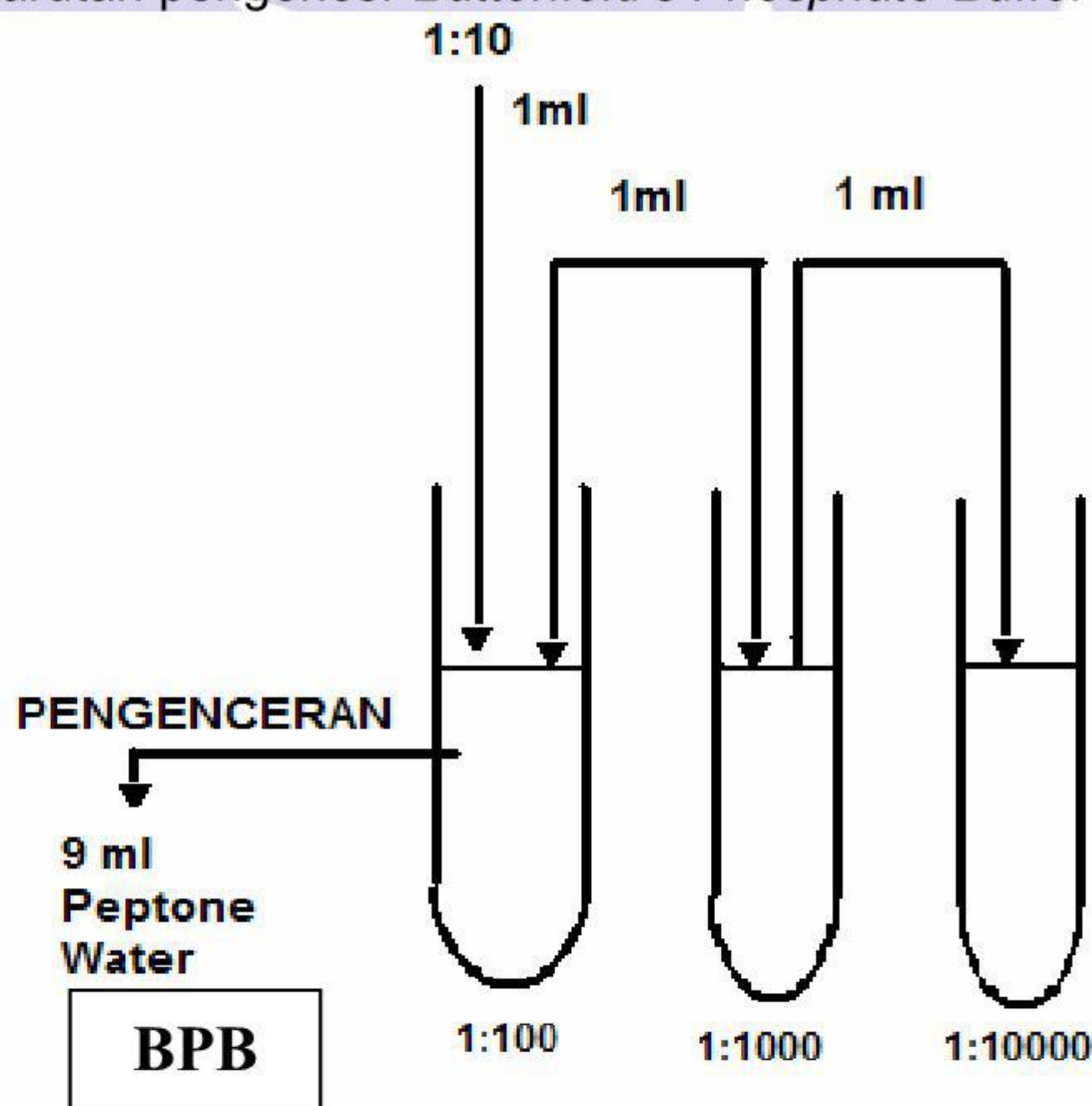
**B.10.2.3 Pembenihan dan pengencer**

- a) *Plate count agar* (PCA)
- b) *tryptone* 5 g
- c) *yeast extract* 2,5 g
- d) glukosa 1 g
- e) agar 15 g
- f) air suling 1000 ml

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol 1000 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

**B.10.2.4 Cara kerja**

- a) buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar 1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);



**Gambar B.1 - Metoda pengenceran**

- b) pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^1$  sampai  $10^4$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- c) tuangkan 12 ml - 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu ( $45 \pm 1$ ) °C ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;



- e) kerjakan inspeksi blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- h) catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni - 250 koloni setelah 48 jam.

#### B.10.2.5 Perhitungan

**Angka lempeng total (koloni/g) =  $n \times F$**

dengan:

$n$  adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, (koloni/g);

$F$  adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

#### B.10.2.6 Pernyataan hasil

##### B.10.2.6.1 Cara menghitung

- a) pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni - 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni - 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c. jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni - 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

$C$  adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

$n_1$  adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

$n_2$  adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

$d$  adalah pengenceran pertama yang dihitung;



Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d. jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.
- Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e. jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah;
- f. menghitung koloni perambat.
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu:
- Merupakan rantai yang tidak terpisah;
  - Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan;
  - Perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### B.10.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas; contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5 maka bulatkan kebawah; contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
  - Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$



### B.10.3 Bakteri *coliform*

#### B.10.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

#### B.10.3.2 Peralatan

- cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- botol pengenceran ( $\pm 20$  ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- lemari pengering (Inkubator), ( $35 \pm 1$ ) °C;
- tabung reaksi dan tabung Durham;
- rak untuk tabung reaksi;
- jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ( $45,5 \pm 0,2$ ) °C.

#### B.10.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LST) broth*;
- Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;

#### B.10.3.4 Cara kerja

##### B.10.3.4.1 APM - *Presumptive test* untuk Bakteri *coliform* (Uji Dugaan)

- lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1.4.
- Inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Laurylsulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik - 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama ( $48 \pm 2$ ) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- $(24 \pm 2)$  jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "**positif**";
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "**negatif**", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi ( $48 \pm 2$ ) jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri coliform untuk tabung-tabung yang negatif;
- lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

##### B.10.3.4.2 APM - *Confirmed Test* untuk Bakteri *coliform* (Uji Penegasan)

- Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu ( $35 \pm 1$ ) °C selama ( $48 \pm 2$ ) jam;
- Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel B, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung



BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;

e) Laporkan sebagai APM bakteri coliform per gram.

**Tabel B.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh**

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

#### B.10.4 *Clostridium perfringens*

##### B.10.4.1 Prinsip

Pertumbuhan *Clostridium perfringens* yang dapat mereduksi sulfat pada media selektif yang dicirikan oleh terbentuknya koloni berwarna hitam dan yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

##### B.10.4.2 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- Peptone water
- Reagent nitrit
- Buffered Glycerol Salt Solution
- TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine)
- D- Cycloserine Solution
- Egg Yolk Emulsion
- Buffered Motility Nitrat Medium
- Sporulation Broth
- Polypeptone Yeast Ekstrak (PY) Medium
- Fluid Thioglycollate Medium
- Lactose Gelatin



**B.10.4.3 Peralatan**

- a) Pipet 1ml dan 10 ml terkalibrasi
- b) Alat penghitung koloni
- c) Blender
- d) Anaerobic Jar
- e) Tabung reaksi 150 mm x 16 mm , 125 mm x 16 mm, 100 mm x 15 mm
- f) Cawan Petri
- g) Inkubator terkalibrasi

**B.10.4.4 Cara kerja****B.10.4.4.1 Uji duga**

- a) timbang 50 g contoh ke dalam blender yang steril secara aseptik. Tambahkan 450 ml *peptone water* dan homogenisasikan selama 2 menit pada kecepatan rendah (13000 rpm);
- b) buat tingkat pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-6}$  menggunakan larutan pengencer *peptone water*. Contoh: untuk  $10^{-2}$ : pindahkan 10 ml pengenceran  $10^{-1}$  ke dalam 90 ml *peptone water*;
- c) tuang masing-masing 5 ml TSC Agar ke dalam 10 cawan petri, sebarkan dengan cepat dan ratakan;
- d) pada saat agar telah membeku, pipet secara aseptik 1 ml contoh yang telah homogen dari masing-masing pengenceran secara duplo pada bagian tengah cawan petri;
- e) tuangkan kembali 15 ml TSC Agar tanpa *egg yolk* ke dalam petri. Campur dengan baik dan putar dengan hati-hati;
- f) atau dengan cara lain, dengan menggunakan tangkai penyebar, sebarkan 0,1 ml contoh diatas cawan petri yang berisi medium TSC Agar yang mengandung *egg yolk* ;
- g) biarkan medium terserap oleh contoh 5 menit – 10 menit, kemudian lapisi dengan 10 ml TSC agar lagi, tanpa *egg yolk*;
- h) pada saat agar telah membeku, tempatkan cawan petri didalam anaerobik jar. Kondisi diusahakan anaerobik dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 20 jam untuk TSC Agar tanpa *egg yolk* dan 35 °C selama 24 jam untuk TSC Agar dengan *egg yolk*;
- i) setelah inkubasi selesai, pindahkan cawan petri dari jar dan amati secara visual untuk pertumbuhan dan adanya koloni berwarna hitam;
- j) pilih cawan cawan petri yang menunjukkan perkiraan 20 koloni sampai 200 koloni hitam, dan hitung jumlah *Clostridium* spp/gr contoh;
- k) *Clostridium perfringens* di dalam medium yang mengandung *egg yolk* berwarna hitam dan biasanya disekelilingnya memiliki zona putih sepanjang 2 mm sampai 4 mm sampai mempunyai aktifitas lesitin. Akan tetapi beberapa strain lemah atau negatif lesitin

**B.10.4.4.2 Uji Penegasan**

- a) pilih 10 koloni dari cawan Petri yang mengandung 20 koloni – 200 koloni, inokulasikan masing-masing ke dalam tabung *Fluid Thioglycollate medium* dan inkubasikan selama 18 jam sampai 24 jam pada suhu 35 °C
- b) buat pewarnaan gram dari kultur *Fluid Thioglycollate medium* dan cek kemurniannya. *Clostridium perfringens* mempunyai bentuk batang pendek, tebal, gram positif.
- c) streak kultur dari TSC Agar yang mengandung *egg yolk* dan inkubasikan cawan petri pada suasana anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C untuk mendapatkan kultur murni
- d) inokulasikan pada *Buffered motility nitrat* dan *Lactose gelatin* media sepanjang 2 mm dari kultur *Fluid Thioglycollate* atau yang diisolasi dari TSC Agar
- e) inokulasikan 1ml pada *sporulation broth* yang diambil dari *Fluid Thioglycollate medium* dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C



- f) uji tabung-tabung *Buffered Motility Nitrat Medium* dengan lampu pemancar untuk melihat pertumbuhan sepanjang tusukan. *Clostridium perfringens* adalah organisme non motil, tumbuh hanya didalam dan sepanjang garis tusukan, sedangkan organisme motil tumbuh menyebar keluar di dalam medium menjauhi tusukan
- g) uji *Buffered Motility nitrat medium* untuk adanya reduksi nitrat, dengan menambahkan 0,5 ml reagent A dan 0,2 ml reagent B. Warna oranye dalam waktu 15 menit menunjukkan adanya nitrat, jika tidak ada perubahan warna tambahkan beberapa butir serbuk Zn dan tunggu 10 menit. Jika tetap tidak ada perubahan warna setelah ditambahkan serbuk Zn menunjukkan bahwa nitrat telah tereduksi. Perubahan ke warna oranye menunjukkan bahwa organisme tidak mampu mereduksi nitrat
- h) uji Lactose Gelatin medium untuk timbulnya gas dan perubahan warna dari merah ke kuning, menunjukkan bahwa Lactose terfermentasi dengan memproduksi asam
- i) buat pewarnaan gram dari *sporulation broth* dan uji secara mikroskopik untuk sporanya. Jika tidak terbentuk spora, maka laporkan tidak memproduksi spora. Simpan kultur spora pada 4 °C jika ingin menguji lebih lanjut
- j) identifikasi *Clostridium perfringens* adalah non motil, bentuk batang, gram positif dengan memproduksi koloni berwarna hitam di dalam TSC agar, mereduksi nitrat menjadi nitrit, menghasilkan asam dan gas dari uji lactose Gelatin akan mencair dalam waktu 48 jam.

#### B.10.4.5 Perhitungan

Hitung Jumlah *Clostridium perfringens* di dalam contoh uji dengan dasar persentase (%) dari koloni yang betul-betul *Clostridium perfringens*. Contoh: Jika rata-rata dari pengenceran  $10^{-4}$  ada 85 koloni yang diduga *Clostridium perfringens* dan dari 8 koloni yang diuji adalah betul-betul *Clostridium perfringens*, maka jumlah *Clostridium perfringens* / g contoh adalah  $85 \times (8/10) \times 10.000 = 680.000$

#### B.10.5 *Salmonella*

##### B.10.5.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella*.

##### B.10.5.2 Peralatan

- a) neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- b) kertas pH;
- c) pipet 10 ml;
- d) pipet tetes;
- e) botol pengencer 1000 ml;
- f) tabung reaksi;
- g) gelas ukur 10 ml, dan 100 ml;
- h) cawan petri 90 mm – 100 mm dan 140 mm – 150 mm;
- i) gelas sediaan;
- j) inkubator 35 °C;
- k) oven;
- l) penangas air;
- m) pengaduk gelas;
- n) sengkelit (ose) / jarum inokulasi;
- o) pensil lilin;



- p) bunsen;
- q) otoklaf.

### B.10.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus terbuat dari individual ingredien, bukan formulasi komersial);
- b) *tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant green*);
- c) *xylose lysine desoxycholate broth* (XLD);
- d) *hektoen enteric agar* (HE);
- e) *bismuth sulfite agar* (BSA);
- f) *triple sugar iron agar* (TSI);
- g) *buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) *urea agar*;
- i) *brilliant green dye solution* 1 %;
- j) air destilata steril;
- k) pereaksi indol dan pembenihan indol;
- l) *lysine decarboxylation medium* (LDC);
- m) *nutrient agar*;
- n) *reagen kovacs*;
- o) *polyvalent somatic (o) test*;
- p) *polyvalent flagellar (h) test*;
- q) 1 N HCl;
- r) 1 N NaOH;
- s) larutan *physiological saline* 0,85 %;
- t) larutan *potassium hydroxide* 40 %;
- u) larutan *formalized physiological saline*;
- v) *rapid urea broth*;
- w) *mac conkey agar*;
- x) *simmon citrate agar*;
- y) *triptone broth*;
- z) *lactose broth*;
- aa) *trypticase (tryptic) soy broth*;
- bb) *trypticase soy-trytose broth*;
- cc) *malonate broth*;
- dd) *lysine iron agar*;
- ee) *potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- ff) *phenol red carbohydrate broth*;
- gg) *purple carbohydrate broth*;
- hh) *brain heart infussion* (BHI) *broth*;
- ii) *tryptose blood agar base*;
- jj) *bromcresol purple dye solution*, 0,2 %;

### B.10.5.4 Cara kerja

#### B.10.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) timbang 25 g contoh ke dalam botol pengencer 500 ml dan tambahkan 225 ml *Lactose broth* steril, kocok merata sampai tidak ada gumpalan;
- b) biarkan pada suhu ruang selama  $(60 \pm 5)$  menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai  $6,8 \pm 0,2$  dengan menambahkan 1 N NaOH atau 1 N HCl steril ;
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *Brilliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata;
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya ( $\frac{1}{4}$  putaran), inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C.



**B.10.5.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)**

- kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 1 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 100 ml RV *medium* dan pipet 10 ml biakan prapengkayaan ke dalam 100 ml *tetrathionate broth*;
- inkubasikan RV *medium* pada suhu  $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dan TT *broth* pada  $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam.

**B.10.5.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif**

- kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE, dan BS agar. Siapkan BS agar satu hari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama  $24 \pm 2$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ ;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*;  
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :  
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media agar selektif setelah  $(24 \pm 2)$  jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut :  
XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.  
HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.  
BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media sekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama  $(24 \pm 2)$  jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA selama inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxilase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu  $5 ^\circ\text{C} - 8 ^\circ\text{C}$ ;
- inkubasi TSI dan LIA pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya  $\text{H}_2\text{S}$  yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan dengan atau tanpa  $\text{H}_2\text{S}$  (warna kehitaman agar). Pada LIA kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk  $\text{H}_2\text{S}$  pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media



LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai no. f) di atas;

- i. lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
  - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, RV ;
  - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

### B. 10.5.5 Identifikasi *Salmonella*

#### B.10.5.5.1 Kultur campuran

Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *Mac Conkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Amati koloni yang diduga *Salmonella* :

- a) *Mac Conkey agar*;  
Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- b) *Hektoen Enteric (HE)*;  
Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- c) *Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar*.  
Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.  
Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti butir B.10.4.4.3.f dan lanjutkan seperti pada butir B.10.4.4.3.g.

#### B.10.5.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease konvensional;  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *urea agar*. Inkubasikan selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
- b) Uji urease cepat;  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea broth*. Inokulasikan 2 jam dalam *water bath* pada suhu  $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ . Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna)

#### B.10.5.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a. *Lysine Decarboxylase Broth (LDB)*;  
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Warna negatif ditunjukkan dengan warna



kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya;

b. *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5% *dulcitol*;

Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c. *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

- *Potasium Cyanida (KCN) broth*;

Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN broth. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan. Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*;

Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang *Malonate broth* tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna ) pada *broth* ini.

- Uji indol.

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml *reagent kovacs*. Amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* bila reaksi indol positif dan flagellar (H) negatif atau KCN positif dan LDB negatif;

#### B.10.5.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan *reaksi urease* negatif ke dalam:  
1) *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam - 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau 2) *Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C (untuk uji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas;

b) Siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar (H) antisera*. Masukkan  $\pm 0,5$  ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar (H) antisera* dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized antigen*. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C – 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.

- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;

- Negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol



**B.10.5.5.5 Uji serologi dengan *polyvalent somatic* (o)**

- a) Dengan menggunakan pensil lilin, Buat garis persegi panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau kaca gelas sediaan;
- b) Emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 - 48 jam dengan 2 ml 0,85 % saline menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *Tryptose Blood agar base* tanpa darah);
- c) Tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- d) Tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent Somatic* (o) anti serum ke dalam bagian yang lain;
- e) Campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit;
- f) Klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
  - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan;
  - Negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran /homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan;
  - Tidak spesifik : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran /homogenisasi tes, pada kontrol saline.

**B.10.5.5.6 Uji biokimia tambahan**

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada tabel B.3 butir 1 – 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi Flagellar (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada butir B.10.4.5.1 di atas dan uji kembali pada butir B.10.4.5.2. Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel B.3:

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;  
 Inokulasi *broth* ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam - 48 jam. Inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam.  
 Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.  
 Dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.;
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;  
 Ikuti prosedur seperti pada B.10.4.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA.
- c) *Methyl Red - Voges Proskauer* (MR – VP);  
 Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C.  
 Lakukan uji Voges-Proskauer (MR-VP) pada suhu ruang sebagai berikut :  
 Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama 48 jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama 48 jam pada suhu 35 °C. Tambahkan 0,6 ml alpha naftol dan aduk. Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima



pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif.

*Uji merah metil (MR)*

Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif;

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) *Simmons citrate agar*;

Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama  $(96 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C.

Positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dan hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil sitrat positif.

Negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

#### B.10.5.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.2. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.3. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari butir B.10.5.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

**Tabel B.2 - Reaksi biokimia dan serologi *Salmonella***

No.	Uji substrat	Hasil Reaksi Positif	Hasil Reaksi Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi Species <sup>a</sup>
1	Glucose	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2	Lysine decarboxylase (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3	H <sub>2</sub> S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
4	Urease	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	-
5	Lysine decarboxy Broth	Warna ungu	Warna kuning	+
6	Phenol red dulcitol broth	Warna kuning dengan gas	Tanpa/tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ <sup>b</sup>
7	KCN broth	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	Malonate broth	Warna biru	Tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
9.	Indol test	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-



Tabel B.2 – (lanjutan)

No.	Uji substrat	Hasil Reaksi Positif	Hasil Reaksi Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi Species <sup>a</sup>
10.	<i>Polyvalent flagellar test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
11.	<i>Polyvalent somatic test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	<i>Voges-prokquer test</i>	Ungu sampai merah	Tidak berubah warna	-
15.	<i>Methyl red test</i>	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons Citrate</i>	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	v
<b>Keterangan :</b> <sup>a</sup> + adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari - adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari v adalah variabel <sup>b</sup> adalah mayoritas dari kultur Arizona : negatif <sup>c</sup> adalah mayoritas dari kultur Arizona : positif				

Tabel B.3 Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella*

No.	Test Substrat	Hasil
1.	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu merah)
2.	<i>Test indol dan test polivalen flagellar (H)</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3.	<i>Lysine decarboxylase dan KCN broth</i>	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)
4.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) <sup>a, b</sup>
5.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) <sup>b</sup>
6.	<i>Voges- Prokquer test methyl red test</i>	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)
<b>Keterangan :</b> <sup>a</sup> <i>Test malonate broth</i> positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut <i>Salmonella arizonae</i> <sup>b</sup> Jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i>		

### B.10.6 Kapang / khamir

#### B.10.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang/ khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari.

#### B.10.6.2 Peralatan

- a) cawan petri 15 mm x 100 mm;
- b) pipet ukur 1 ml dan 10 ml;



- c) penangas air ( $45 \pm 1$ ) °C;
- d) inkubator 25 °C terkalibrasi;
- e) alat penghitung koloni;
- f) mikroskop;
- g) pH meter.

#### B.10.6.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media:

- a) media dengan penambahan larutan antibiotik;
  - *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) agar;
  - *dichloran 18 % glycerol* (DG 18) agar;
 antibiotik ditambahkan di media kapang/khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.
- b) *plate count agar* (PCA);
  - tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang *spreader* (contoh *mucor*, *rhizopus* dll);
- c) *malt agar* (MA);
- d) *malt extract agar* (kapang dan khamir) (MEAYM);
- e) *potato dextrose agar* (PDA), tersedia komersial:
 

<i>infusion from white potatoes</i>	200 g
dextrose	20 g
agar	20 g
air suling	1000 ml

 Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

#### B.10.6.4 Cara kerja

- a) lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai B.10.1;
- b) terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
  - metode menyebar pada cawan :
    - pipet 0,1 ml masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan batang gelas.
  - metode menuang pada cawan :
    - pipet 1,0 ml masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm x 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 ml -25 ml media. Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka 1 menit - 2 menit.
- c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- d) pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^{-1}$  -  $10^{-2}$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- e) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari;
- f) hitung koloni kapang/khamir (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai hari ke lima). Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam;
- g) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang/khamir per gram contoh;



**B.10.6.5 Pernyataan hasil****B.10.6.5.1 Cara menghitung**

Cara menghitung kapang/khamir seperti cara menghitung pada angka lempeng total.

**B.10.6.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka**

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang/khamir seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.





## Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Food*, Atomic Absorption Spectrophotometric Methode, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods*, AAS Methode, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry, 2005, AOAC off Methode 983.18, Meat and Meat products, Preparation of Test Sample, 18 th ed.chapter 39.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry, 2005, AOAC off Methode 983.18, Nitrogen in Meat, 18 th ed.chapter 39.1.15.
- Association of Official Analytical Chemistry, 2005, AOAC off Methode 991.36, Meat and Meat products, Fat (Crude) in Meat and Meat products, 18 th ed.chapter 39.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry, 2005, AOAC off Methode 950.46B(6), Moisture in Meat and Meat products, 18 th ed.chapter 39.1.02.
- Association of Official Analytical Chemistry, 2005, AOAC off Methode 920.36, Ash in Meat and Meat products, 18 th ed.chapter 39.1.09.
- CODEX Alimentarius Commission.1996. *FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Food (AQL-6.5) CAC/RM 42-1969*.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Eschericia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2006. *Salmonella*. Chapter 5.

















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)